Revue suisse Zool.	Tome 87	Fasc. 4	p. 875-880	Genève, décembre 1980

Ultrastruktur und Funktion der Paragonien von *Drosophila funebris* [1]

von

H. FEDERER und **P. S. CHEN**

Mit 3 Abbildungen

ABSTRACT

Ultrastructure and function of the paragonia in Drosophila funebris. — Electron microscopic analysis of the paragonia (accessory glands) in male adults of *Drosophila funebris* showed that the glandular cells are already functionally differentiated at the time of emergence. The endoplasmatic reticulum and the Golgi-complex appear to be fully active. In addition to a large number of various types of vacuoles the cytoplasm of the secondary cells contains giant protein granules, the so-called filamentous bodies, which may become partially fused. By contrast, in the pupae about 1½ days prior to emergence the paragonial cells are still at an initial stage in the development of the above mentioned organelles.

In virgin male flies aged about 4-7 days there is an enormous accumulation of secretory fluid in the lumen. In the viscous secretion large fibers and bundles of filaments similar to microtubules are clearly visible. Following copulation ultrastructural changes related to the elevated RNA and protein synthesis can be observed. The significance of the paragonial proteins in sperm transfer is discussed.

EINLEITUNG

Unsere bisherigen Untersuchungen über die Fortpflanzungsbiologie bei *Drosophila* haben gezeigt, dass die Paragonien (akzessorische Drüsen) der adulten Männchen eine grundlegende Bedeutung einnehmen (zusammenfassende Literatur in CHEN 1971, 1978; FOWLER 1973). Im Lumen dieser Drüsen befindet sich ein visköses Sekret, welches

---

[1] Ausgeführt mit Unterstützung durch den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung und der Georges und Antoine Claraz-Schenkung.

Vortrag gehalten an der Jahresversammlung der SZG in Lausanne, 8.—9. März 1980.

neben freien Aminosäuren und deren Derivaten zahlreiche Proteine enthält. Das Sekret wird während der Kopulation in die Genitalien der weiblichen Fliege übergeführt und muss stets neu synthetisiert werden. Es wurde nachgewiesen, dass die Begattung die Synthese der Paragonienstoffe, vor allem Proteine und Ribonukleinsäuren (RNS), stimuliert (von Wyl & Steiner 1977, Chen 1979).

Aufgrund elektronenoptischer Untersuchungen der Paragonien bei *Drosophila melanogaster* stellte Bairati (1968) im einschichtigen Drüsenepithel zwei Zelltypen fest: Haupt- und Sekundärzellen. Letzere enthalten riesige Proteingranulen mit spulenartig aufgewundenen Filamenten (filamentous bodies). Perotti (1971) postuliert einen holokrinen Sekretionsmechanismus. In der vorliegenden Arbeit wurden die Paragoniendrüsen von *Drosophila funebris* elektronenoptisch untersucht. Es sollte abgeklärt werden, inwiefern die Funktion der sekretorischen Zellen mit der Differenzierung ihrer Ultrastruktur korreliert ist. Ferner interessieren wir uns, ob infolge der Stimulation der Protein- und RNS-Synthese durch die Begattung entsprechende strukturelle Änderungen auf elektronenoptischen Bildern erkennbar sind. Es handelt sich hier um eine vorläufige Mitteilung. Die einzelnen Ergebnisse werden in einer späteren Publikation veröffentlicht.

MATERIAL UND METHODEN

Puppen und Imagines eines Wildstammes von *Drosophila funebris* wurden auf Standardfutter und bei 25° C aufgezogen. Unmittelbar nach dem Schlüpfen wurden die Männchen von den Weibchen getrennt. Für die Kopulation brachten wir ein isoliertes Männchen im Alter von 4 Tagen mit einem virginellen Weibchen zusammen. Nachher wurden die Fliegen wieder getrennt und die Männchen nach einer bestimmten Zeit für die Untersuchung gebraucht.

Paragonien wurden aus Puppen (1½ Tage vor dem Schlüpfen) sowie 0-, 4- und 7 tägigen Fliegen herausseziert und in 2% Glutaraldehyd in 0,2 M Millonig während 1 h fixiert. Die Nachfixierung erfolgte in 1% OsO_4 (1 h). Anschliessend wurden sie in 5% Uranylacetat während 15 min kontrastiert, in einer Acetonreihe dehydriert und in Spurr eingebettet. Semidünnschnitte wurden mit Toluidinblau gefärbt, Ultradünnschnitte mit Uranylacetat und Bleicitrat nach Sato (1967) kontrastiert. Sämtliche Präparate wurden mit einem Zeiss EM 9S-2 Elektronenmikroskop untersucht.

ERGEBNISSE

Die Paragoniendrüsen bei Puppen, die ca. 1½ Tage vor dem Schlüpfen stehen, sind noch sehr klein und besitzen wenig strukturierte Zellen. Das Lumen ist praktisch leer. In den Zellen findet man runde Kerne, viele freie Ribosomen und gut ausgebildete Mitochondrien. Hingegen ist das zelluläre Membransystem nur ansatzweise zu erkennen. Die Hauptzellen sind nahezu frei von Vakuolen. Die Sekundärzellen weisen ein etwas weiter entwickeltes endoplasmatisches Retikulum und eine grössere Golgi-Region auf. Vakuolen und Proteingranulen mit Mikrofilamenten kommen erst in bescheidenem Mass vor.

Zur Zeit des Schlüpfens ist die Differenzierung der Paragonienzellen bereits weiter fortgeschritten. Das Lumen ist mit Sekret gefüllt. Die Hauptzellen sind hochprismatisch, die Sekundärzellen birnenförmig. Die Zellkerne haben eine gelappte Form und weisen oft Heterochromatin auf (Abb. 1). Das endoplasmatische Retikulum ist zisternenartig,

die Golgi-Komplexe sind zahlreich und mächtig angeschwollen. Wie aus Abbildung 1 erkennbar ist, befinden sich im Cytoplasma der Sekundärzellen zahlreiche verschiedenartige Vakuolen und grosse, aus Mikrofilamenten bestehende Proteingranulen (filamentous bodies), die teilweise miteinander verschmolzen sind.

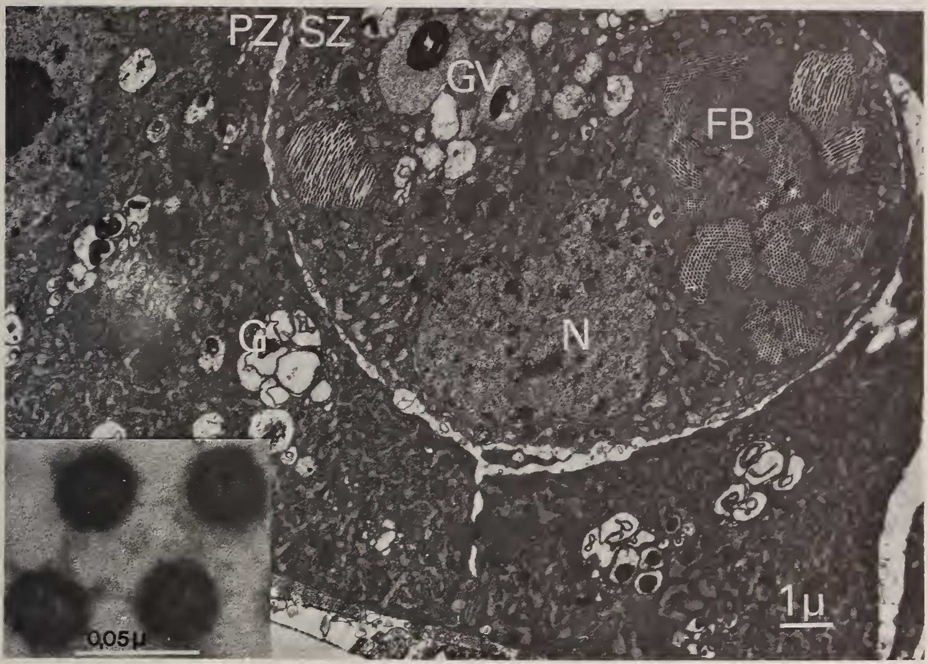


ABB. 1.

Haupt- und Sekundärzellen der Paragoniendrüsen einer frisch geschlüpften männlichen Fliege. Inset: Quer getroffene Filamente eines Proteingranulums (filamentous body) bei hoher Vergrösserung. PZ = Hauptzelle, SZ = Sekundärzelle, FB = „Filamentous body", GV = Graue Vakuole, N = Nucleus, G = Golgi-Komplex.

Im Laufe der nächsten 4—7 Tage ist das Lumen prall mit Sekret gefüllt (Abb. 2); nebst flockigen Proteinen finden wir Fibrillen von 500 Å Durchmesser, die das Lumen einzeln oder in Gruppen durchqueren, sowie eine grosse Zahl von Filamentbündeln, die aus ca. 100 Å dicken Mikrofilamenten bestehen. Die Hauptzellen sind stark abgeplattet, mit extrem gelappten Kernen und stapelförmigem endoplasmatischem Retikulum. Die Sekundärzellen erscheinen rundlich und enthalten eines oder mehrere Filamentgranulen, die bis zu 70% des Zellvolumens einnehmen können.

Kurz nach der Kopulation schwellen die zahlreich vorhandenen Golgi-Komplexe der Hauptzellen wieder stark an. Vakuolen werden gebildet und kommen nach etwa 3 h in grosser Menge vor. Die Sekundärzellen weisen teilweise noch degenerative Merkmale auf, und die Filamentgranulen liegen meist ungeordnet im Zellinnern.

Die Entwicklung der filamenthaltigen Granulen ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt. Vor dem Schlüpfen sind diese in den Sekundärzellen ansatzweise erkennbar.

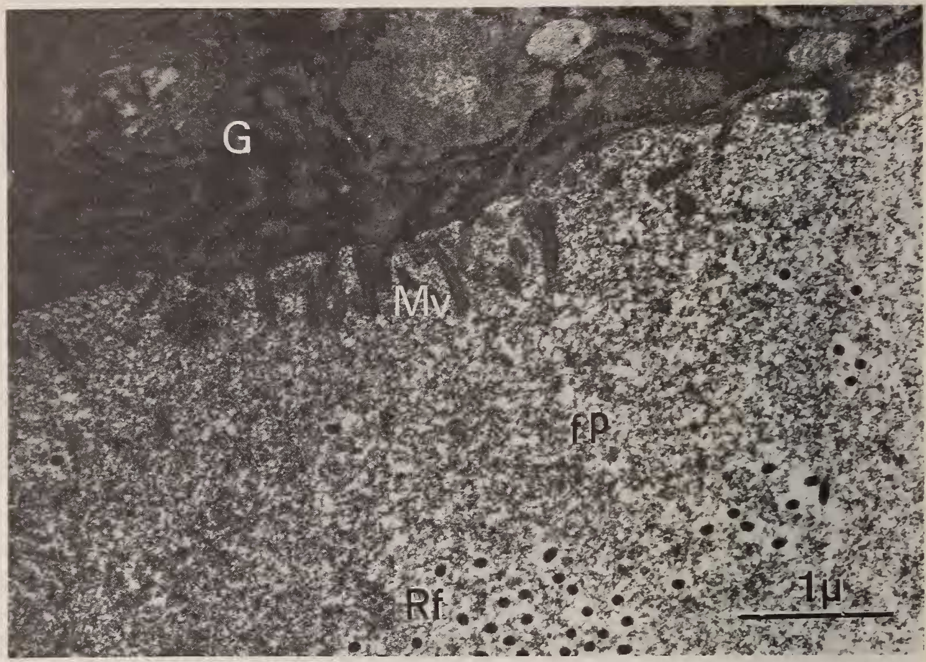


ABB. 2.

Teil der Paragoniendrüse einer virginellen männlichen Fliege im Alter von 7 Tagen: Grenze einer Hauptzelle zum Lumen. G = Golgi-Komplex, Mv = Mikrovilli, fP = flockige Proteine, Rf = Riesenfibrillen.

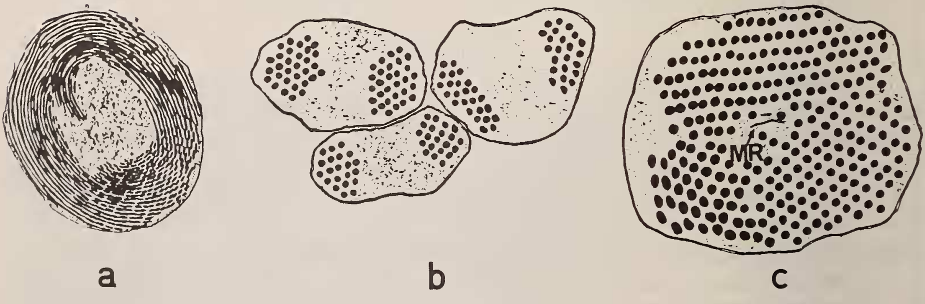


ABB. 3.

Schematische Darstellung der Entwicklung der sogenannten „filamentous bodies" in einer Sekundärzelle. Die Filamente sind längs (a) und quer (b, c) dargestellt. In (c) ist die Fusion von 3 Granulen erkennbar. MR = Membranreste. Weitere Erklärung im Text.

Um eine homogene elektronenopake Matrix winden sich Filamente von 300 bis 340 Å Durchmesser (Abb. 3*a*, *b*). Sie bestehen aus 10 globulären Untereinheiten von ca. 75 Å Durchmesser. Die Spulenfunktion der Matrix wird deutlich in Abbildung 1, wo junge Granulen median getroffen sind. Beim Schlüpfen kann man bereits Filamentgranulen feststellen, die aus mehreren miteinander fusionierenden kleinen Granulen zusammengesetzt sind, und gelegentlich finden sich noch Membranreste an den Fusionsstellen (Abb. 3*c*). Bei 4- bis 7tägigen Fliegen sind oft Granulen in einer „twist"-Form anzutreffen, bei denen die Filamente S-förmig verdreht sind, und die homogene Matrix ihre Spulenform verliert.

DISKUSSION

Unsere Untersuchungen zeigen, dass die Paragonien bei *Drosophila funebris* zur Zeit des Schlüpfens noch nicht vollständig einsatzbereit sind, obwohl ihre Zellen bereits eine weitgehend abgeschlossene ultrastrukturelle Differenzierung aufweisen. Erst 2—3 Tage später treten die Drüsen in eine aktive Sekretionsphase ein, was mit dem natürlichen Beginn der Kopulationsbereitschaft zusammenfällt. Nach unseren Befunden können die Hauptzellen nicht als Ersatzzellen betrachtet werden, da sie spezifische Produkte ins Lumen sezernieren, die nie in Sekundärzellen gefunden wurden. Ausserdem ist der Sekretionsmechanismus der Hauptzellen eindeutig merokrin, während derjenige der Sekundärzellen holokrin zu sein scheint. Allerdings haben wir bis jetzt noch nie intakte Filamentgranulen im Lumen beobachtet.

Die funktionelle Bedeutung der Sekretproteine ist noch nicht abgeklärt. Die Riesenfibrillen (500 Å) im Lumen unterscheiden sich von den Filamenten (300 Å) im Durchmesser. Möglicherweise sind die Riesenfibrillen umgewandelte Filamente mit zusätzlich angelagerten Proteinen, oder die Kristallstruktur der Filamente in den Granulen lässt sich schlechter kontrastieren als die frei durch das Lumen ziehenden Fibrillen. Aufgrund morphologischer Ähnlichkeit werden die Filamente von Bairati (1966, 1968) und Perotti (1971) als Mikrotubuli charakterisiert. Demnach müsste es sich um kontraktile Elemente handeln, die für den Spermientransport oder die Spermienbewegung bei der Befruchtung von Bedeutung sein könnten. Gegenwärtig sind wir daran, die Natur der Proteine in den Fibrillen und Filamenten mittels immunologischer Methoden zu prüfen.

LITERATUR

Bairati, A. 1966. Filamentous structures in spermatic fluid of *Drosophila melanogaster* Meig. *J. Microsc. (Fro)* 5: 265-268.

— 1968. Structure and ultrastructure of the male reproductive system in *Drosophila melanogaster* Meig. *Monitere zool. ital.* 2: 105-182.

Chen, P. S. 1971. Biochemical Aspects of Insect Development. *Karger, Basel.*

— 1978. Protein synthesis in relation to cellular activation and deactivation. In « Biochemistry of Insects » (M. Rockstein, ed.), pp. 145-203. *Acad. Press, New York.*

— 1979. Auftrennung der RNS in den Paragonien von *Drosophila* mittels Gradienten-Formamidgel-Elektrophorese. *Revue suisse Zool.* 86: 817-821.

Fowler, G. L. 1973. Some aspects of the reproductive biology of *Drosophila*: sperm transfer, sperm storage and sperm utilization. *Adv. Genet.* 17: 293-360.

PEROTTI, M. E. 1971. Microtubules as components of *Drosophila* male paragonia secretion. An electron microscopic study, with enzymatic tests. *J. submicrosc. Cytol.* 3: 255-282.

SATO, T. 1967. A modified method for lead staining of thin sections. *J. Electron Microsc.* 16: 133.

VON WYL, E. and E. STEINER. 1977. Paragonial proteins of *Drosophila melanogaster* adult male: in vitro biosynthesis. *Insect Biochem.* 7: 15-20.

Anschrift der Verfasser :

Zoologisches Institut der Universität
Winterthurerstrasse 190
CH-8057 Zürich (Schweiz)